

**Title**

Fermentative production of L-threonine

**Inventor Name**

Nakayama, Kiyoshi; Kobata, Mamoru; Tanaka, Yoshitake; **Nomura, Tadaaki**

**Patent Assignee**

Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Japan

**Publication Source**

Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 3 pp.

**Identifier-CODEN**

JKXXAF

**Patent Information**

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
JP 50025790	A2	19750318	JP 1973-80275	19730718 <—
JP 55042630	B4	19801031		

**Priority Application Information**

JP 1973-80275	19730718
---------------	----------

**Abstract**

L-threonine (I) was produced by *Protaminobacter candidus* or *Methanomonas methylovora*. Thus, *P. candidus* ATCC 21372 was cultured on a medium (pH 7.2) contg. MeOH 20 ml; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10, urea 1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, and CaCO<sub>3</sub> 20 g; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10, MnSO<sub>4</sub>·4-5H<sub>2</sub>O 8, thiamine-HCl 1, and phenol red 10 mg, and biotin 10 .mu.g in 1 l. at 30° for 67 hr. MeOH was added at 1% after 16 hr and at 2% each after 24 and 40 hr cultivation; the pH was adjusted with 2N NH<sub>4</sub>OH. Prodn. of I was 50 mg/l. To 3 l. culture broth, 60 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O was added with stirring. The resulting ppt., CaCO<sub>3</sub>, and cells were removed by centrifugation. The supernatant was concd. under reduced pressure and the resulting ppt. was removed thus yielding 55 ml supernatant. I in the supernatant was adsorbed on Diaion SK 1 (H+) at pH 2, eluted with 0.25N NH<sub>4</sub>OH, and crystd. with addn. of EtOH yielding 65 mg crystals.

**International Patent Classification**

C12D

**Document Type**

Patent



**Language**

Japanese

**Accession Number**

1975:477000 CAPLUS

**Document Number**

83:77000





(2000円)

特 許 願

昭和48年7月18日

特許庁長官 殿

1. 発明の名称

発酵法によるL-スレオニンの製造法

2. 発明者

住 所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号  
氏 名 中山 隆 (ほか2名)

3. 特許出願人

郵便番号 100  
住 所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号  
名 称 (102)協和醗酵工業株式会社  
代表者 高 田 弘

4. 添付書類の目録

(1) 明 細 書 1通 方式  
(2) 願 書 四 本 1通 特許庁

明 細 書

1. 発明の名称

発酵法によるL-スレオニンの製造法

2. 特許請求の範囲

プロタミノバクター属またはメタノモナス属に属するL-スレオニン生産性菌株を、該菌株の発酵しうる炭酸源、窒素源、無機物およびその他の栄養源を含有する培地に培養し、培養物からL-スレオニンを抽出、採取することからなるL-スレオニンの製造法。

3. 発明の詳細な説明

L-スレオニンは、人間や動物にとって栄養上必須のアミノ酸の一つであり、医薬、食品、飼料などに広く利用されている必要物質である。

従来、微生物を利用するL-スレオニンの製造法としては、グルコースなどの糖質を原料とする方法（特公昭38-14399号公報）、ソルビトールやマルトールを原料とする方法（特

① 日本国特許庁

公開特許公報

①特開昭 50-25790

③公開日 昭50.(1975) 3. 18

②特願昭 48-80275

②出願日 昭48.(1973) 7. 18

審査請求 未請求 (全3頁)

庁内整理番号

7110 4P

⑤日本分類

36(1)D251

⑤Int.Cl<sup>2</sup>

C12D 13/06

国特許第2937121、同2937122）、

以化水素を原料とする方法（特開特許第

3232380、同3604653）、エタノール

を利用する方法（特公昭47-29号公報）、

アトロモバクター属およびシュードモナス属に

属し、メタノール発酵性を有する菌株を利用す

るメタノールからL-スレオニンを製造する方

法（特公昭43-25273号公報）などが知ら

れている。

しかしながら、前記特公昭43-25273号

公報によれば、メタノールからのL-スレオニ

ンの生成量は、1/1〜2/10の範囲であり、

満足すべきものではない。

本発明者らは、アトロモバクター属およびシ

ュードモナス属以外の菌株についてメタノール

からのL-スレオニンの生産について検討した

結果、たとえば、プロタミノバクター・カンデ

イダス（*Protonobacter candidus*）

ATCC3173およびメタノモナス・メテロ

ボータ（*Methanomonas methylovora*）

ATCC 21369 の培液中に L-スレオニンが生成するのを見出した。

このようにプロタミノバクター菌およびメタノモナス菌の菌株による L-スレオニンの生産については従来未知のものであり、本発明が最初のものである。

以下本発明の方法について説明する。

菌株としては、プロタミノバクター菌およびメタノモナス菌に属し、L-スレオニンを生成する能力を有するものを使用する。

その具体例としては、プロタミノバクター・カンディダス ATCC 21372 およびメタノモナス・メテロボラ ATCC 21369 があげられ、これらの菌株については、その菌学的性質が米国特許 3663370 に記載され既知である。

菌株の培養のための培地としては、使用する菌株の炭化しうる炭素源、窒素源、無機物、その他の栄養源をほとんど含有するものを利用する。

たとえば、プロタミノバクター・カンディダ

スもしくはその消化物などの窒素性有機物質など種々のものが使用可能である。

さらに無機物として硝酸第一カルシウム、硝酸第二カルシウム、硝酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硝酸第一鉄、硝酸マンガ、炭酸カルシウムなどを使用する。

また、本発明に使用する微生物が生育のために特定の栄養源を必要とする場合はその栄養源を適当な培地に存在せしめなければならないが、この種の栄養源は前述の窒素性有機物質に含まれて加えられる場合があり、その際は特に添加する必要はない。

培養は振盪あるいは静置空気流槽などの好気的條件で行う。培養温度は通常 20~40℃ の範囲で、培地の pH は 3~9 の範囲に、好ましくは中性付近に保持することが望ましいが、これ以外の pH 条件あるいは pH 条件下でも菌が生育すれば実施可能である。培地の pH 調整は炭酸カルシウム、pH 緩衝剤、あるいは酸またはアルカリ溶液を添加することにより目的を達

特開 昭50-25790 の  
ス ATCC 21372 およびメタノモナス・メテ  
ロボラ ATCC 21369 を利用する場合は、  
炭素源としてメタノールを使用する。

その他の菌株を使用する場合は、該菌株の炭素源の炭化性をチェックしてそれぞれに適したものを選択して使用する。

メタノールを炭素源として使用する場合、培養初期から高濃度に使用すると微生物の生育を阻害することがあるので、通常は 0.5~3% の低濃度で培養を開始し、その後、必要に応じて少量 (0.5~3%) ずつ逐次添加することが好結果を生じる。

培地の窒素源としては塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウムなどの各種無機物もしくは有機物のアンモニウム塩、またはアンモニア、尿素、アミン類その他の窒素含有化合物、ならびにペプトン、ロイシン、肉エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、加水分解物、フィブシニールもしくはその消化物、炭素大

するが、使用菌株によつては pH 調整を必要としない場合がある。

上記の方法に従つて 1~3 日間培養を行つと培養液中に L-スレオニンが生成する。

培養終了後、菌体および炭酸カルシウムなどの沈澱物を除去し、実施例にも示す様なイオン交換樹脂処理によつて培養液より L-スレオニンを採取する。その他公知のイオン交換樹脂処理法、透析法、吸着法、沈澱法などを併用することによつても L-スレオニンを回収することが出来る。

以下、本発明の実施例を示す。

実施例 1

菌株としてプロタミノバクター・カンディダス ATCC 21372 を使用した。

この菌株を初培養培地 (メタノール 20 ml (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 mg, H<sub>4</sub>BO<sub>4</sub> 4 mg, サイアミン塩 1 mg, ビオチン 10 mg を水に溶解して 1 l とした (pH

7.2) )で30℃、24時間振盪培養し、この培養液100ccを発酵培地(メタノール20cc、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10g、尿素1g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g、 $\text{VOSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  8mg、サイアミン塩酸塩10mg、ビオチン10μg、炭酸カルシウム20g、フェノールレッド(pH指示薬)10mg)を水に溶解して1ℓとした培地(pH7.2)100ccを含む250cc容三角フラスコに接種して、30℃で振盪培養を行なつた。この際メタノールを培養開始16時間後に1ℓ、24時間、40時間後にそれぞれ25g(合計75g)添加し、かつ培地のpHを規定アンモニア溶液で中性付近に調節した。かくして培養67時間後の培養液中のL-スレカニンの生成量は50mg/ℓであつた。

培養終了後、培養液を30℃塩化カルシウム・  
メタ塩の粉末60gを攪拌しながら徐々に加入、  
生成した沈下物、炭酸カルシウムおよび固体を  
回収して除き、減圧下で乾燥して生成した沈下

特開 昭50-25790(3)  
を再び過して除き、上清液を分離した。この  
上清液のpHを2に調整した後、強酸性イオン  
交換樹脂ダイヤイオンBE-1 (H<sup>+</sup>型) (三菱  
化成社製)のカラムに過してL-スレオニンを  
吸着させ、0.1M規定アンモニア水で溶出して  
L-スレオニンを含む百分を集め、濃縮後、エ  
タノールを添加しながら品出させ、L-スレオ  
ニンの結晶を得た。収得6.5g。

### 实施例 2

和剤としてメタノマス・メチロガーラ  
ATCC 21669 を使用する他は実施例1の場合  
と同様に培養したところ培養液中のL-スレ  
オニン生成は3.5 mg/l であった。

特許出願人 (102) 協和醫藥工業株式會社

代發者 高 田 弘

上掲圖以外の四角者

館 所 京都府京都市南区西九条五丁目

匠 公

東京都町田南金井町農の台園地

3133  
D - D - D 68






東京世界圖書大店 3-3-6

△ 村 自 亮

THIS PAGE BLANK (USPTO)